

|         |  |
|---------|--|
| 氏名      | 楊 信 志  |
| 授与した学位  | 博 士  |
| 専攻分野の名称 | 学 術  |
| 学位授与番号  | 博甲第2813号   |
| 学位授与の日付 | 平成16年 9月30日  |
| 学位授与の要件 | 自然科学研究科生命分子科学専攻<br>(学位規則第4条第1項該当)  |
| 学位論文の題目 | STUDIES ON CULTURE OF RAT OOCYTES SOON<br>AFTER SPERM PENETRATION<br>(精子侵入直後のラット卵子の培養に関する研究) |
| 論文審査委員  | 教授 丹羽皓二    教授 奥田 潔    教授 近藤康博  |

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、ラット 1-細胞後期胚の限定培地(mR1ECM)での発生促進のために精子侵入直後の卵子(1-細胞前期胚)の前培養に必要な因子を見い出す目的で行われた。交配翌日の7:30～8:00に Wistar 系成熟雌ラットから採取した 1-細胞前期胚を、卵丘細胞除去後に異なる条件を有した培地で 5 時間前培養後、mR1ECM で培養を継続した。まず、mKRB で前培養した結果、培地中のリン酸(Pi)の有無にかかわらず高い胚盤胞形成率が得られた。しかし、牛血清アルブミン(BSA)をポリビニルアルコール(PVA)と置換して mR1ECM と同じ浸透圧(246 mOsM)に調整した mKRB で前培養すると、胚盤胞形成率は有意に低下した。さらに、PVA を BSA と置換した mR1ECM (mR1ECM-BSA)の浸透圧を NaCl 濃度の増加あるいは sorbitol の添加により 304 mOsM に調整して(304 mOsM-mR1ECM-BSA)前培養した結果、Pi 不含の mKRB での前培養に等しい胚盤胞形成率が得られた。つぎに、mR1ECM および 304 mOsM-mR1ECM-BSA を用いて 1-細胞前期胚を前培養した結果、前培養1時間後までに全ての侵入卵子において精子頭部が膨化し、2時間後までに雄性前核が形成され始め、3～4時間後に雄性前核の形成が終了した。また、304 mOsM-mR1ECM-BSA で0～5時間前培養後に mR1ECM で培養を継続した結果、胚盤胞形成率は、前培養時間の延長にともなって徐々に増加し、前培養0時間と比較して3時間において有意に増加した。一方、精子侵入直後の卵子を mR1ECM と 304 mOsM-mR1ECM-BSA でそれぞれ異なる時間連続して計5時間前培養した結果、桑実胚と胚盤胞の形成率は、5+0時間の組合わせと比較して、それぞれ2+3および1+4時間の組合わせの前培養において有意に高くなった。これらの結果から、ラット 1-細胞後期胚の mR1ECM での発生促進にとって、前期胚から後期胚に至る間、とくに精子頭部が膨化してから前核の形成が終了するまでの間に必要な因子として BSA と浸透圧の両者が重要であることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

ラット1-細胞後期胚の発生用に開発された限定培地(mR1ECM)を用いて精子侵入直後の卵子を直接培養すると胚盤胞への発生が抑制される。しかし、精子侵入直後の卵子(1-細胞前期胚)を他の培地(mKRB)で一定時間前培養すれば、mR1ECMでの発生能は維持される。本研究は、mR1ECMとmKRBにおいて見られる主要な相違点(リン酸の有無、浸透圧値、および添加高分子物質の種類)に着目し、mR1ECMでの発生促進のために1-細胞前期胚にとって必要な前培養中の因子とそれらの因子を必要とする精子侵入卵子の発生時期を見い出す目的で行なわれたものであり、次のような新しい知見を得ている。

交配翌日の07:30~08:00にWistar系成熟雌ラットから採取した1-細胞前期胚を、異なる条件を有した培地で5時間前培養後にmR1ECMで培養した結果、mKRBにおいて前培養中のリン酸の有無は胚盤胞への発生に影響を及ぼさなかった。しかし、リン酸の有無に係わらず、通常のmKRBと比較して牛血清アルブミン(BSA)をポリビニルアルコール(PVA)と置換して浸透圧を246 mOsMに調整したmKRBで前培養することによって、胚盤胞形成率は有意に低下した。また、PVAをBSAと置換したmR1ECM(mR1ECM-BSA)において、浸透圧をNaCl濃度の増加あるいはソルビトールの添加により304 mOsMに調整した結果、リン酸不在のmKRBでの前培養に等しい胚盤胞形成率が得られた。つぎに、同じ培地で0~5時間前培養後にmR1ECMで培養を継続した結果、 $\geq 4$ -細胞期、 $\geq$ 桑実期および胚盤胞期に発育した胚の割合は、前培養時間の延長にともなって徐々に増加し、前培養0時間と比較して3時間において有意に増加した。一方、mR1ECMおよび304 mOsMの浸透圧を有するmR1ECM-BSAでそれぞれ異なる時間連続して計5時間前培養した結果、 $\geq$ 桑実期および胚盤胞期に発育した胚の割合は、5+0時間の組み合わせと比較して、それぞれ2+3および1+4時間の組み合わせの前培養において有意に高くなった。これらの結果から、ラット1-細胞後期胚のmR1ECMでの発生促進にとって、前期胚から後期胚に至る間、とくに精子頭部が膨化してから前核の形成が終了するまでの間に必要な因子としてBSAと浸透圧の両者が重要であることが示唆された。

これらの知見は、哺乳動物初期胚の培養に関する研究の進展に寄与するのみならず、実験動物として重要なラットにおける種々の発生工学的研究の促進などの実用面においても極めて有用なものである。本学位審査委員会は本論文の内容および参考論文を総合的に審査し、本論文が、博士(学術)の学位に値するものと判定した。